

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 24 SEP 2004

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 103 35 584.7

Anmeldetag: 31. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH,
35394 Gießen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle

IPC: C 12 P, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**[Zusammenfassung]**

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Zyklierung von Peptiden und Proteinen, bei dem lineare Thioester als Substrate dienen. Die Zyklierung wird durch Thioesterasse-Domänen von NRPS- oder PKS-Zyklasen katalysiert. Die erfindungsgemäßen Substrate bestehen aus einem linearen Peptid, an das eine ladungsstabilisierte aromatische, heteroaromatische oder aliphatische Abgangsgruppe gebunden ist. Diese Substrate führen zu höheren Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten von mit bisherigen Verfahren zyklierbaren linearen Peptiden und gestatten darüber hinaus auch die Zyklierung solcher Peptide, die bisher nicht zyklierbar waren.

An. 146/Mar/Sieb

[Patentanmeldung]

Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle

Auf der Suche nach neuen Medikamenten geraten Naturprodukte
5 zunehmend in den Fokus der Wissenschaft und dienen ihr als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Diese pharmakologisch relevanten Moleküle werden von Bakterien oder Pilzen synthetisiert, und ihr Wirkungsspektrum reicht von

10 - antibiotischen (Infektionskrankheiten) über
- zytostatischen (Krebs) bis zu
- immunsuppressiven (Organtransplantation) Eigenschaften.

Die Synthese dieser kleinen Moleküle erfolgt in der Natur meist an großen Multienzymen, die hauptsächlich Peptide, Polyketide oder ein Hybrid aus beiden herstellen. Prominente
15 Beispiele für solche Verbindungen sind Penicillin, Cephalosporin, Daptomycin, Epothilon und Cyclosporin, die zum Teil schon seit langer Zeit erfolgreich in der Medizin eingesetzt werden. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Verbindungen ist die zyklische Struktur, die für die biologische Aktivität
20 entscheidend ist. Viele der oben genannten Verbindungen besitzen keine oder eine stark verminderte Wirksamkeit, wenn sie linear vorliegen. Im Gegensatz zu linearen Molekülen ist bei zyklischen Molekülen die konformativische Flexibilität (die freie Bewegung und Rotation) durch den Ringschluss
25 vermindert, was nur die biologisch aktive Form in Erscheinung treten lässt. Die Natur hat hier eine interessante Strategie gewählt, die sicherstellt, dass das synthetisierte Molekül in nur einer Modifikation vorkommt und daher spezifisch mit nur einem „Target“ (Angriffsziel) im biologischen System interagiert. Angriffsziele sind meistens essentielle Bestandteile
30 oder Funktionen einer Zelle, die für ihr Überleben wichtig sind, wie z.B. die Zellwand oder die Proteinsynthese. Da

An.146/Mar/Sieb

- diese Moleküle selektiv bakterielle, fungale oder cancerogene (Krebs-) Zellen bzw. Viren eliminieren und gleichzeitig körpereigenes Zellgewebe verschonen, sind sie in der Therapie von Infektionskrankheiten und Krebs von enormer Bedeutung.
- 5 Daneben können sie auch die von T-Zellen verursachte Immunabwehr unterdrücken, was die Organabstoßung bei Transplantationen wirksam verhindert (Cyclosporin). Durch den intensiven Einsatz in der Medizin haben aber leider viele dieser Verbindungen ihre Wirksamkeit verloren, da die
- 10 10 zu bekämpfenden Systeme Resistenzmechanismen entwickelt haben. Darüber hinaus besitzen viele potente Wirkstoffe sehr starke Nebenwirkungen, was ihren medizinischen Einsatz einschränkt (z.B. Nierentoxizität von Bacitracin). Daher besteht ein großer Bedarf an neuen bzw. optimierten Chemotherapeutika
- 15 15 (Antibiotika, Cytostatika und Immunsuppressiva), die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen und hoch spezifisch mit ihrem „Target“ interagieren. Für die Identifizierung solcher neuen Wirkstoffe können die bereits bekannten, poten-ten zyklischen Naturprodukte als Leitstruktur dienen und
- 20 20 systematisch verändert und auf verbesserte Wirksamkeit getestet werden.

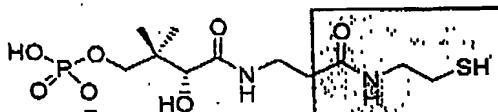
Derartige Naturstoffe werden im biologischen System von nicht ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt und von sogenannten Thioesterasen/Zyklasen zyklisiert, die sich in

- 25 25 guter Ausbeute rekombinant *in vitro* überproduzieren lassen. Diese Enzyme können zuverlässig und effizient lineare Peptide einer bestimmten Leitstruktur in zyklische Moleküle überführen. Die Triebkraft der Zyklisierungsreaktion im natürlichen System ist die Aktivierung des C-Terminus (d. h. der freien
- 30 30 Carbonsäure des linearen Peptids) durch eine Thioesterab-gangsgruppe, dem Kofaktor Phosphopantethein. Im artifiziellen System wird die rekombinante Zyklase mit einem verkürzten Thioester-Mimic dieses natürlichen Kofaktors umgesetzt (N-

An.146/Mar/Sieb

Acetylcysteamin, SNAC). Unter verkürzten Thioester-Mimics sind dabei Substanzen zu verstehen, die

- die Funktion des natürlichen Kofaktors imitieren, aber nicht natürlichen Ursprungs sind,
- 5 - eine Thio-Abgangsgruppe besitzen und deren aliphatische Kette kürzer ist als die des natürlichen Kofaktors Phosphopantethein.



Phosphopantethein und SNAC (markiert)

10

Mit der SNAC-Abgangsgruppe konnten bisher die Tyrocidin- und Surfactin- Zyklasten charakterisiert werden. Viele andere biologisch relevante zyklische Verbindungen, wie z.B. Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zeigen bei

- 15 Verwendung der SNAC-Abgangsgruppe keine Zyklisierungsaktivität mit dem jeweiligen Enzym, was mit einer inkorrekt Faltung des Enzyms erklärt wird. Andere Verbindungen, wie z.B. CDA (Calcium dependent antibiotic) und Bacillibactin zeigen zum Teil sehr schlechten Umsatz mit den bekannten
- 20 Substratanaloga.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nicht natürliche, synthetische Kofaktoren, deren chemische Abgangsgruppenquali-
 25 täten für eine effiziente Enzymacylierung sorgen. Entgegen der allgemein in der Fachwelt verbreiteten Annahme findet keine „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym statt, weshalb einzig das chemische Übertragungspotenzial des Acylrestes auf das aktive Zentrum im Enzym die
 30 entscheidende Größe ist. Die in der Fachwelt verbreitete Annahme, die „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym sei der Ausschlag gebende Faktor für

An.146/Mar/Sieb

die Zykлизierungsreaktion, ist beispielsweise dargestellt in JW Trauger, RM Kohli, HD Mootz, MA Marahiel and CT Walsh, *Nature* 2000, 407: 215-218; R Aggarwal, P Caffrey, PF Leadley, CJ Smith and J Staunton, *Journal of the Chemical Society Communications* 1995, 15: 1519-1520 sowie RS Gokhale, D Hunziker, DE Cane and C Khosla, *Chemical Biology* 1999, 6: 117-125.

Im Gegensatz zu den etablierten SNAC-Substraten weist z.B. Thiophenol als erfindungsgemäße ladungsstabilisierte Abgangsgruppe keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor auf, besitzt aber eine deutlich bessere Abgangsgruppenqualität, da sich das Thiol in Konjugation mit einem aromatischen Benzolring befindet. Bei anderen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen befindet sich die Thiol- oder Hydroxyfunktion an einem sp^3 -Kohlenstoffatom, das direkt an den aromatischen Ring gebunden ist (α -C-Atom), so dass das aromatische System einen induktiven Effekt auf die Thio- oder Hydroxygruppe ausübt. Derartige erfindungsgemäße Abgangsgruppen werden nachfolgend als aliphatische Thio- oder Hydroxyabgangsgruppen bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass sich der induktive Effekt eines aromatischen Systems stabilisierend auf die an ein α -C-Atom gebundenen Gruppen auswirkt und damit ihre Abgangsgruppenqualität erhöht. Dies kann z.B. in Michael B. Smith & Jerry March: *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*. 5th Edition 2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore nachgeschlagen werden. Im Falle des SNACs ist weder eine Konjugation mit einem aromatischen oder heteroaromatischen System noch eine Stabilisierung durch den induktiven Effekt eines aromatischen Systems in α -Stellung zum Kohlenstoffatom, an das die Thiogruppe gebunden ist, vorhanden, weshalb viele Enzyme keine Aktivität mit diesen Substraten zeigen oder niedrige K_{cat}/K_M Werte aufweisen.

An.146/Mar/Sieb

[Beschreibung und Stand der Technik]

Viele wertvolle Pharmazeutika besitzen zyklische Strukturen, wobei die Ringe dieser zyklischen Strukturen aus 5 oder mehr Atomen gebildet sind. Die aus dem Stand der Technik bekannten

5 Methoden der synthetischen Chemie zur Darstellung zyklischer Verbindungen weisen zahlreiche Nachteile auf. Zu diesen Nachteilen gehören beispielsweise, aber nicht ausschließlich, geringe Ausbeuten der zyklischen Produkte, die Notwendigkeit von Schutzgruppen, um reaktive funktionelle Gruppen zu blockieren oder zu schützen, sowie die Notwendigkeit, diese Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchzuführen. Diese synthetischen Probleme können durch enzymatische Verfahren überwunden werden.

Die EP 0 832 096 B1 beschreibt ein Verfahren, mit dem ein 15 nicht oxidiertes N-terminales Cystein eines ersten Oligopeptids mit dem C-terminalen Thioester eines zweiten Oligopeptids umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch ein Thiol katalysiert, wobei die Thiogruppe direkt an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Dabei bildet sich 20 ein β -Aminothioester als Zwischenprodukt, der sich spontan intramolekular umlagert, wobei die Amidbindung des Ligationsproduktes der beiden Oligopeptide entsteht. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass das erste Oligopeptid zwingend ein N-terminales Cystein besitzen muss und dass es nicht für 25 Zyklisierungsreaktionen geeignet ist.

Dagegen beschreibt die US 6,307,018 B1 eine allgemeine Methode, um ein erstes C-terminales α -Thioesterpeptid mit einem zweiten N-terminalen Aminosäure-Peptidsegment zu verbinden, bei der das N-terminale Aminosäure-Peptidsegment kein N-30 terminales Cystein besitzen muss. Allerdings muss das zweite Oligopeptid eine sekundäre Aminogruppe aufweisen, die über das N-Atom dieser sekundären Aminogruppe an eine nicht oxidierte Sulfhydrylgruppe eines aromatischen Thiols gebunden ist. Bei dem aromatischen Thiol kann es sich um Thiophenol,

An.146/Mar/Sieb

Benzylmercaptan oder ein S-Alkylbenzylmercaptan handeln. Darüberhinaus ist bei der US 6,307,018 B1 nachteilig, dass entweder der C-Terminus des ersten oder der N-Terminus des zweiten Oligopeptids Glycin sein muss. Die Methode ist nicht 5 für die Zyklisierung von Peptiden geeignet.

Die US 2002/0192773 A1 beschreibt ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung makrozyklischer Moleküle, bei dem rekombinante Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem PKS- oder NRPS-Multidomänen-System mit einem Substrat umgesetzt werden, wobei das Substrat einen über eine Thioesterabgangsgruppe aktivierten Acylrest und ein anhängendes Nucleophil enthält. Aktivierter Acylrest und Nucleophil sind über ein lineares Rückgrat voneinander getrennt. Nachteilig hierbei ist, dass die Abgangsgruppe nicht ladungsstabilisiert 10 ist.

Durch eine unzureichende Zyklisierungsaktivität vieler Enzyme bei Verwendung strukturell analoger Abgangsgruppen zum natürlichen Kofaktor wie beispielsweise Coenzym A, Phosphopantethein und N-Acylcysteamin sind TE-Domänen in ihrer Anwendung jedoch stark limitiert. Die vorliegende Erfindung überwindet durch den Einsatz neuartiger Abgangsgruppen diese Einschränkung und ermöglicht nun die Erstellung von diversen zyklischen Wirkstoffbibliotheken vieler pharmakologisch 25 bedeutender Molekülklassen.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde gefunden, dass die Erkennung der Substrate durch Enzyme bei der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen keine Rolle spielt und dass ladungsstabilisierte Thio- und Hydroxyverbindungen gute Abgangsgruppen für die Acylierungsreaktion von 30 Peptidzyklasen darstellen. Unter ladungsstabilisierten Thio- und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy-

An.146/Mar/Sieb

oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist. Die vorliegende Erfindung stellt Substrate bereit, mit deren Hilfe die enzymatische Zyklisierung von solchen Peptiden und Proteinen möglich ist, die nach dem Stand der Technik nicht der Zyklisierung zugänglich waren. Des weiteren kann die Ausbeute von Proteinen und Peptiden, die mit Methoden des Standes der Technik zyklisiert werden können, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Substrate gesteigert werden. Darüber hinaus liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren, um weitere an der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen beteiligte Substrate chemisch zu verändern und damit der Zyklisierung leichter zugänglich zu machen.

15

[Aufgabe der Erfindung]

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, das Verfahren zur Darstellung zyklischer Peptide durch Umsetzung linearer Peptide mit Peptidzyklasen zu verbessern, wobei unter Verbesserung eine Erhöhung der Ausbeute an zyklischem Peptid und / oder eine Beschleunigung der Zyklisierungsreaktion und / oder eine Zyklisierung von mit bisherigen Verfahren nicht zyklisierbaren Peptiden verstanden wird. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens mittels Substraten in Form linearer Peptide, wobei diese linearen Peptide ladungsstabilisierte Abgangsgruppen besitzen und das Zentrum von Peptidzyklasen selektiv acylieren. Unter „Substraten“ werden hierbei lineare Peptide verstanden, an die eine nucleophile, ladungsstabilisierte erfindungsgemäße Abgangsgruppe chemisch gebunden ist. Unter ladungsstabilisierten Thio- und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem

An.146/Mar/Sieb

verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen oder heteroaromatischen Systems so gewählt ist, dass eine an der Thio- oder Hydroxygruppe auftretende negative Ladung stabilisiert wird. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu höheren Ausbeuten an zyklischen Peptiden und / oder verbessert ihre Ausbeute und ermöglicht es erstmalig, auch Peptide wie Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zu zyklisieren, die mit den Methoden des Standes der Technik nicht zyklisierbar sind.

10

Die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Substrate erfolgt durch die Synthese des linearen Peptids mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Standardmethoden der Fastphasenpeptidsynthese, darauf folgende Kupplung der freien Carbonsäure des linearen Peptids (freie Peptidsäure) an die erfindungsgemäße Thiol- oder Hydroxy-Abgangsgruppe, optionale Reinigung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates, darauf folgende Umsetzung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates mit einer Peptid-Zyklase und Reinigung des auf diese Weise erhaltenen zyklischen Peptids.

Dazu werden 1 Äquivalent (eq) der freien Peptidsäure mit 2 eq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 2 eq N-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 10 eq der jeweiligen Abgangsgruppe versetzt und in THF für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 0,5 eq Kaliumkarbonat wird die Reaktion für weitere 2,5 h agitiert und darauf filtriert, um ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff (DCH) abzutrennen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Peptid mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA), 2,5 % Wasser und 2,5 % Triisopropylsilan für 3 h entschützt. Das Reaktionsgemisch wird darauf in eiskalten Diethylether gegeben, worauf das Substrat präzipitiert. Dieser Schritt stellt eine Reinigung dar, bei der Reaktionsnebenprodukte abgetrennt werden, und führt zu einer Reinheit des Substrates

An.146/Mar/Sieb

von bis zu 80%, was im Allgemeinen für die weitere Umsetzung des Substrates mit einer Peptidzyklase ausreichend ist.

Optional kann die Reinheit des Substrat anschließend mittels präparativer HPLC erhöht werden.

- 5 Enthält das lineare Peptid neben der C-terminalen freien COOH-Gruppe weitere freie COOH-Gruppen innerhalb der Peptidkette, wie beispielsweise COOH-Gruppen von Glutaminsäure und / oder Asparaginsäure, so müssen diese nicht C-terminalen freien COOH-Gruppen vor der Umsetzung des linearen Peptids
- 10 mit einem Aktivierungsreagenz mit einer geeigneten orthogonalen Schutzgruppe geschützt werden, die nach Darstellung des erfindungsgemäßen Substrates wieder abgespalten werden muss. Geeignete Schutzgruppen und geeignete Methoden zu deren Entfernung sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise in Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, „Protective groups in organic synthesis“, 2nd Edition 1991, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore nachgeschlagen werden.
- 15 Das gereinigte Substrat mit der erfindungsgemäßen Abgangsgruppe wird darauf mit der jeweiligen Peptidzyklase im Verhältnis 1 (Enzym) : 100 (Substrat) in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 und Raumtemperatur für 30-60 min inkubiert. Die Herstellung der HEPES-Lösung ist dem Fachmann bekannt und wurde in J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. I-III*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, beschrieben. Die Identifizierung und Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt mittels analytischer HPLC.
- 20
- 25
- 30 Alternativ zum Aktivierungsreagenz DCC lassen sich die erfindungsgemäßen Substrate auch durch Umsetzung der Peptidsäure mit der jeweiligen Abgangsgruppe in Gegenwart anderer, den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenzien umsetzen. Entsprechungen sind bekannt und können, ohne den Schutzbe-

An.146/Mar/Sieb

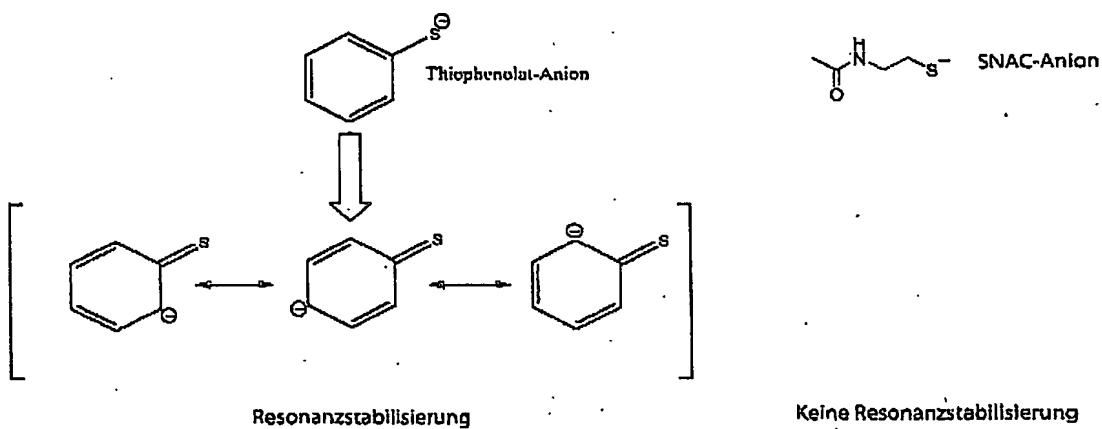
reich der Patentansprüche zu verlassen, verwendet werden. Hierzu zählen beispielsweise die dem Fachmann bekannten Aktivierungsreagenzien DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl und 3-Cl-1-Pyridiniumiodid. Als Kupplungsadditive 5 sind neben dem oben aufgeführten HOt beispielsweise auch die dem Fachmann bekannten Substanzen HOAt und HONB verwendbar. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Reaktionen zweckmäßig unter Zugabe einer Base wie beispielsweise DIPEA durchgeführt werden. Dem Fachmann sind weiterhin verschiedene Lösungsmittel- 10 tei zur Verwendung in den genannten Verfahren bekannt. Er kann diese Kombinationen von Aktivierungsreagenzien, Kupplungsadditiven, Basen und Lösungsmitteln mit seinem üblichen Wissen und der Standardliteratur selbst herstellen.

15 Als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen werden bei der vorliegenden Erfindung chemische Verbindungen verstanden, die eine Thio- oder Hydroxyl-Gruppe besitzen und bei denen das freie Elektronenpaar des durch die Acylierungsreaktion freigesetzten Thiolat- oder Hydroxylat-Ions in Konjugation mit 20 weiteren Elektronenpaaren von beispielsweise, aber nicht ausschließlich, C=C- oder C=N-Doppelbindungen steht oder bei der die Thio- oder Hydroxygruppe an ein Kohlenstoffatom gebunden ist, das seinerseits an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Solche Verbindungen 25 sind z.B. Oxo- und Thio-aromatische und -heteroaromatische Verbindungen, aber auch ladungsstabilisierte aliphatische Oxo- und Thio- Abgangsgruppen. Diese Abgangsgruppen, wie z.B. Thiophenol, Phenol, 2,3,4,5,6-Pentafluorphenol, die Mercaptoanisole und Thiokresole sowie 2-Hydroxypyridin und 2-Thio 30 pyridin funktionieren für die Acylierungsreaktion von Peptidzyklasen, die keinerlei Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor besitzen, und weisen verbesserte Eigenschaften für *in vitro* Zyklisierungsreaktionen auf.

An.146/Mar/Sieb

Dies soll im Folgenden exemplarisch, aber nicht erschöpfend am Beispiel des Thiophenols erläutert werden:

Die Thiophenol-Abgangsgruppe weist bis auf die Thiolfunktion keine strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen 4'-Phospho-panthethein-Kofaktor auf. Die Thiolfunktion ist direkt an einen aromatischen Phenylring gebunden. Dieses Strukturmerkmal verursacht die gegenüber den bisher beschriebenen Abgangsgruppen höhere Reaktivität dieser Verbindung. Beim nukleophilen Angriff des aktivierte Ser (= Serin) der katalytischen Triade im aktiven Zentrum des Enzyms wird diese Abgangsgruppe als Thiophenolat-Ion freigesetzt. Die resultierende negative Ladung am Schwefelatom kann dabei sehr gut durch den angrenzenden Phenylring delokalisiert werden.



15

Eine derartige Erhöhung und Stabilisierung der Elektronendichte tritt bei den SNAC-, CoA- und P pant-Abgangsgruppen nicht auf. Dort bleibt die negative Ladung am Schwefelatom lokalisiert. Da aber in der Regel die Güte einer Abgangsgruppe proportional zu ihrer chemischen Stabilisierung ist, sind SNAC-, CoA- und P pant chemisch betrachtet schlechtere Abgangsgruppen als Thiophenol.

Dem Fachmann ist bekannt, dass das Austrittsvermögen und damit die Qualität einer Abgangsgruppe von der Fähigkeit der Abgangsgruppe abhängt, eine negative Ladung zu stabilisieren.

An.146/Mar/Sieb

Unter Stabilisierung einer Ladung versteht der Fachmann dabei das Verteilen von Ladungen oder Teilladungen auf mehrere Atome oder Bindungen, so dass diese Ladung oder Teilladung nicht an einem einzigen Atom oder an einer einzigen Bindung

5 innerhalb eines Moleküls lokalisiert ist. Dabei sind dem Fachmann zwei verschiedene Möglichkeiten der Ladungsstabilisierung organischer Moleküle bekannt, die allgemein als mesomere oder Resonanz-Effekte (M-Effekte) und induktive Effekte (I-Effekte) bezeichnet werden. Unter einem mesomeren oder Resonanz-Effekt versteht der Fachmann das schnelle und

10 reversible Verschieben von π -Elektronenpaaren, welches in Systemen auftritt, die konjugierte π -Bindungen besitzen. Dem Fachmann ist bekannt, dass der mesomere Effekt über große Entfernung und damit viele Bindungen hinweg wirksam ist,

15 wenn ein entsprechend ausgedehntes konjugiertes π -System vorliegt. In Ringverbindungen mit konjugierten π -Systemen nehmen auch Substituenten an der Mesomerie teil, sofern sie über freie π -Elektronenpaare verfügen oder diese aufnehmen können. Ist eine Ladung in einer substituierten Ringverbindung mit konjugiertem π -System und mesomeriefähigen Substituenten zu stabilisieren, so hängt es von der Position der Substituenten zueinander ab, ob und welche dieser Substituenten tatsächlich an der Ladungsstabilisierung durch Mesomerie teilnehmen. Dies ist dem Fachmann bekannt.

20 25 Besitzt ein Atom eine höhere Elektronegativität und damit eine stärkere Anziehung auf die Bindungselektronen als sein mit ihm über eine σ -Bindung verbundenes Nachbaratom, oder ist ein Atom mit weiteren Atomen oder Atomgruppen verbunden, die Elektronen ziehend wirken, so wird die Bindungselektronenwol-

30 ke der hier betrachteten σ -Bindung in Richtung auf den Elektronenzug verschoben, d.h. polarisiert. Diese Polarisation einer σ -Bindung wird als Teilladung bezeichnet, da es sich hierbei um eine geringfügige Verschiebung von Elektronenwol-

An.146/Mar/Sieb

ken handelt und diese Verschiebung nicht zum Auftreten ganz-
zahliger Vielfacher der Elementarladung an einem bestimmten
Atom führt. Die durch unterschiedliche Elektronegativitäten
und / oder unterschiedlichen Elektronenzug von Atomen und
5 Atomgruppen hervor gerufene Polarisation von σ -Bindungen wird
vom Fachmann auch als induktiver Effekt bezeichnet. Dem
Fachmann ist bekannt, dass der induktive Effekt für einander
benachbarte Bindungen am größten ist und mit zunehmender
Entfernung zu dem Atom oder der Atomgruppe, das / die ihn
10 hervor ruft, rasch abnimmt. Dies kann z.B. in Michael B.
Smith & Jerry March: *March's Advanced Organic Chemistry.*
Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition 2000, John
Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto
/ Singapore nachgeschlagen werden.
15 Der Fachmann unterscheidet positive und negative mesomere
bzw. induktive Effekte. Als positiv wird ein solcher Effekt
bezeichnet, wenn er die Elektronendichte in Form einer Ladung
oder Teilladung an einem Atom oder einer Atomgruppe erhöht
(+M-Effekt, +I-Effekt), als negativ, wenn er die Elektronen-
20 dichte verringert (-M-Effekt, -I-Effekt). Befinden sich
beispielsweise an einem aromatischen System mehrere Substi-
tuenten, so üben sie ihre M- und I-Effekte unabhängig vonein-
ander aus und können einander verstärkend, aber auch gegen-
läufig in Bezug auf die Ladungsstabilisierung an einem be-
25 stimmten Atom wirken. In der Regel wirken mesomere Effekte
stärker als induktive.
In der vorliegenden Erfindung werden daher bevorzugt solche
ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gewählt, bei denen eine
Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome eines aroma-
30 tischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems
gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem
Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des
aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems
so gewählt ist, dass die Summe der mesomeren und induktiven

An. 146/Mar/Sieb

Effekte der enthaltenen funktionellen Gruppen einen Elektronenzug auf das Thiolat- oder Hydroxylat-Ion ausübt und auf diese Weise dessen negative Ladung stabilisiert.

- 5 Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Quantifizierung der Abgangsgruppenqualität ist der pK_A -Wert einer chemischen Verbindung: Je höher der pK_A -Wert, desto schlechter ist die jeweilige Abgangsgruppe. CoA, Ppant und SNAC haben pK_A -Werte von 10 - 11, während Thiophenol einen pK_A -Wert von 8 aufweist. Es lässt sich somit sagen, dass Thiophenol seine mangelnde strukturelle Überstimmung zum natürlichen Phosphopanthethein-Kofaktor überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik durch seine hohe chemische Reaktivität überkompensieren kann, was auch für andere aromatische, heteroaromatische und ladungsstabilisierte araliphatische Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen gilt. Dabei werden vorteilhaft solche ladungsstabilisierten aromatische, heteroaromatische und araliphatischen Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen als Abgangsgruppen verwendet, deren pK_A -Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 ist. Die Ringsysteme der erfundungsgemäßen aromatischen, heteroaromatischen und araliphatischen Thiol- und Hydroxyverbindungen können durch einen oder mehrere Substituenten mit positiven oder negativen induktiven oder mesomeren Effekten substituiert sein, wobei die Gesamtheit der Effekte aller vorhandenen Substituenten elektronenziehend und damit ladungsstabilisierend auf das bei der enzymatischen Zyklisierung frei gesetzte Thiolat- oder Hydroxylation wirkt.
- 10 20 25 30 Bei Verwendung von ladungsstabilisierten Thiol- und Hydroxyverbindungen zeigen auch solche Enzyme Zyklisierungsaktivität, die bei Verwendung der bisher bekannten Abgangsgruppen als inaktiv klassifiziert wurden (ca. 2/3 aller bisher untersuchten). Enzyme, die auch bei Verwendung von SNAC als Ab-

An. 146/Mar/Sieb

gangsgruppe zyklisieren, zeigen verbesserte kinetische Eigenschaften mit bis zu 15 fach gesteigerten k_{cat}/K_m Werten bei gleich bleibender Regio- und Stereoselektivität, wenn Thiophenol-Derivate an Stelle von SNAC-Abgangsgruppen verwendet

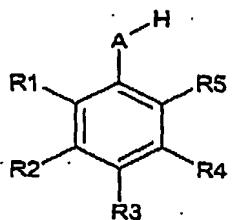
- 5 werden. Dies konnte am Beispiel des Surfactin-Thiophenols gezeigt werden (siehe Fig. 4). Surfactin zeigt ebenfalls verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Zyklisierung, wenn o-, m- oder p-Mercaptoanisol bzw. o-, m- oder p-Thiokresol als Abgangsgruppe verwendet werden.
- 10 Die Katalyse von Peptid-Zyklasen lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen:

- Der erste Teilschritt ist die Ausbildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates durch Acylierung des aktivierten Ser-Restes der katalytischen Triade.
- 15 - Der zweite Teilschritt ist die Deacylierung des Ser-Restes durch eine funktionelle Gruppe der gebundenen Peptidkette als internes Nukleophil.

Thioestergebundene Abgangsgruppen können ausschließlich die katalytische Effizienz des ersten Teilschrittes beeinflussen:

- 20 die Bildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates. Experimente mit der neuen Abgangsgruppe Thiophenol bestätigen dies (siehe Fig. 4 bis Fig. 6). Eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms zeigt keine Aktivität, was die abgangsgruppenbedingte Acylierung und darauffolgende enzymatische Zyklisierung
- 25 bestätigt.

Folgende aromatische, heteroaromatische und aliphatische Grundelemente dienen als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen:



An.146/Mar/Sieb

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sein können:

5 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

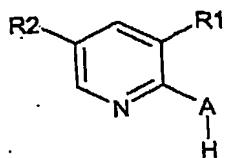
10 wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis

15 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der

20 25 Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,

An.146/Mar/Sieb



(III)

mit

A = O, S und

sowie R1 und R2, die unabhängig voneinander sein können:

5 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁻, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

10 wobei

10 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear

15 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,

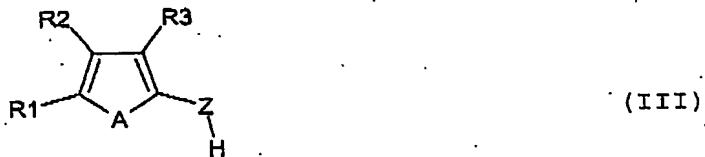
20 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt

25 sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten

30 werden, wobei dem Fachmann bekannt ist, dass Substituenten an

An.146/Mar/Sieb

C-4 oder C-6 des Pyridinringes keine Ladungsstabilisierung des an C-2 befindlichen Hydroxy- oder Thiöl-Substituenten bewirken,

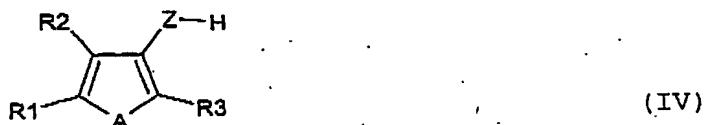


mit

- 5 A = O, S, und
- Z = O, S,
- sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sein können:
- NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -
- 10 C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL⁻, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -
- OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -
- Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -
- Heteroaryl,
- wobei
- 15 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
- 20 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, -
- 25 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt
- 30 sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Tempe-

An.146/Mar/Sieb

raturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten 5 werden,



mit

A = O, S, und

Z = O, S,

10 sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sein können:
 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, 15 -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl

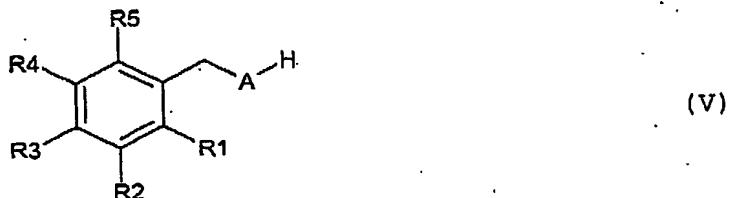
20 für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoff-

25 atomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis

30 zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt

An.146/Mar/Sieb

sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfundungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sein können:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl,

Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-

cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl

An.146/Mar/Sieb

für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfundungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,

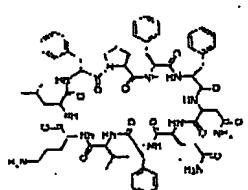
10

Des weiteren können diese Abgangsgruppen den natürlichen Kofaktor auch für andere artifizielle Reaktionen *in vitro* mit Enzymen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen ersetzen. Eine solche Reaktion ist die Kondensationsreaktion zur Knüpfung einer Peptidbindung, katalysiert durch die Kondensationsdomäne (C-Domäne), die auch mit Thioester-gebundenen Substraten arbeitet.

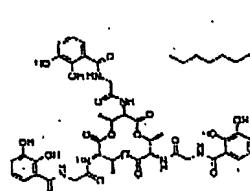
Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde 20 gefunden, dass die Erkennung eines Substrates durch das jeweilige Enzym keine Rolle spielt. Die vorliegende Erfindung stellt somit eine neue und für den Durchschnittsfachmann überraschende Weiterentwicklung des in der US 2002/0192773 A1 beschriebenen Verfahrens zur enzymatischen Herstellung makro- 25 zyklischer Moleküle dar, bei dem gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklen) aus einem PKS- oder NRPS-Multidomänen-System mit einem Substrat umgesetzt werden. Bei den in Frage kommenden Substraten handelt es sich um lineare Peptide und Lipopeptide mit 5 - 22 monomeren Baueinheiten wie z.B. Aminosäuren. Substrate sind beispielsweise Fengycin, Mycosubtilin, Bacillibactin, CDA, Surfactin, Ba-citracin oder Syringomycin und weitere Substrate, die bereits 30 in US 2002/0192773 A1 beschrieben wurden, sowie Pristinamycin, wobei die genannten Substrate zusätzlich eine erfin-

An.146/Mar/Sieb

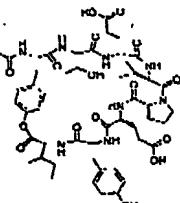
dungsgemäße Abgangsgruppe aufweisen. Einige dieser Substrate sind nachfolgend dargestellt:



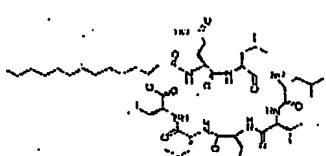
Tyrocidin (Antibiotikum)



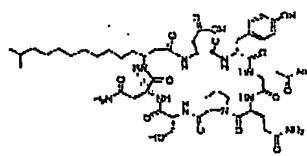
Bacillibactin (Siderophor)



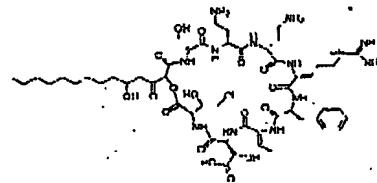
Fengycin (Antifungizid)



Surfactin (Surfactant)



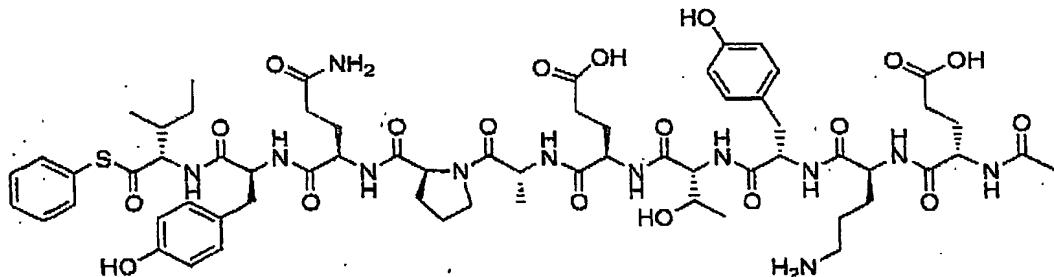
Mycosubtilin (Antifungizid)



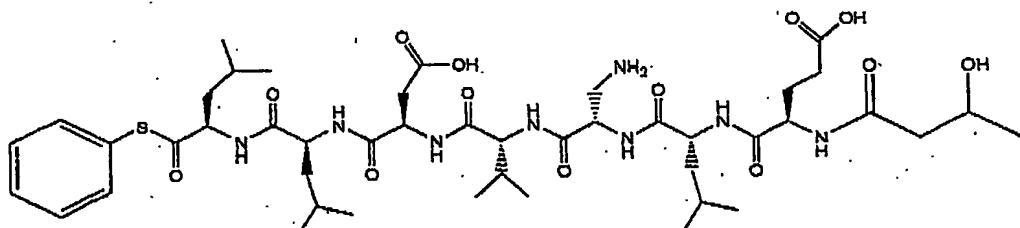
Syringomycin (Phytotoxin)

5

Bioaktive Peptide



Struktur eines Fengycin-Thiophenol Substrates



10 Struktur eines Surfactin-Thiophenol Substrates

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt im Vergleich zum Stand der Technik auch bei solchen linearen Peptiden eine Verbesserung dar.

An.146/Mar/Sieb

rung dar, die bereits mit dem Fachmann bekannten Methoden zyklisiert werden konnten, da das erfundungsgemäße Verfahren die Reaktionsgeschwindigkeit der Zyklierung beschleunigt und / oder zu höheren Ausbeuten des zyklischen Peptids führt.

5

Bei den in Frage kommenden Enzymen handelt es sich um gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen oder Peptid-Zyklasen aus NRPS- oder PKS-Systemen, wie beispielsweise den entsprechenden Domänen bzw. Zyklasen von Fengycin, Mycosubtilin, Bacil-10 libactin, CDA, Surfactin, Bacitracin, Syringomycin, Tyrocidin, Pristinamycin und allen übrigen in US 2002/0192773 A1 aufgeführten Peptid-Zyklasen, Thioesterasen und gereinigten isolierten Thioesterasen.

15 Das lineare Peptid enthält proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren in seinem Rückgrat. Eingebettet in dieses Rückgrat können auch Reste und / oder funktionelle Gruppen sein, die sich nicht von Aminosäuren ableiten wie z.B. gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoff-Spacer. Die 20 fakultativ in das Rückgrat eingebetteten Reste und / oder funktionellen Gruppen wurden bereits in US 2002/0192773 A1 beschrieben. Die erfundungsgemäße Abgangsgruppe wird dabei entweder an der C-terminalen Carbonsäuregruppe oder einer Seitenketten-Carbonsäure angebracht.

25

Die erfundungsgemäße Abgangsgruppentechnologie kann zur Herstellung von Stoffbibliotheken für zyklische Peptide und Proteine verwendet werden, indem neue Substratvarianten strukturell bedeutsamer Moleküle (beispielsweise Fengycin, 30 Mycosubtilin, Syringomycin, CDA, etc.), die bisher keine oder nur geringe Aktivität mit der herkömmlichen Abgangsgruppe SNAC zeigten, hergestellt und auf verbesserte biologische Eigenschaften (antibiotisch, antiviral, antifungal, cytostatisch) getestet werden. Die Substratvarianten werden durch

An.146/Mar/Sieb

kombinatorische Festphasenpeptidsynthese hergestellt und nach
 der oben aufgeführten allgemeinen Vorschrift mit den neuen
 Abgangsgruppen versehen. Bevorzugt wird dabei eine Stoffbib-
 liothek für auf Zielzellen angepasste Peptidantibiotika
 5 hergestellt, wobei es sich um zyklische Peptidantibiotika
 handelt, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens
 hergestellt wurden.

Das erfindungsmäße Verfahren kann zur Herstellung von Zykli-
 10 sierungs-Kits verwendet werden, die Mittel zur Kopplung
 erfindungsgemäßer ladungsstabilisierter Abgangsgruppen sowie
 Peptidzyklen bereit stellen, so dass lineare Peptide mit
 den bereit gestellten Abgangsgruppen zunächst zu erfindungs-
 15 gemäßen Substraten und anschließend mit den bereit gestellten
 Peptidzyklen zu zyklischen Peptiden umgesetzt werden kön-
 nen. Dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits ist aus seinem
 allgemeinen Wissen bekannt, wie er die einzelnen Komponenten
 des Kits, z.B. die Puffer, herstellt, formuliert und lagert.
 20 Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten zyklischen
 Peptide und Proteine können als Arzneimittel für Pati-
 enten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankun-
 gen verwendet werden, bei denen bakterielle und / oder virale
 Infektionen auftreten. Die erfindungsgemäßen zyklischen
 25 Peptide und Proteine können, sofern sie cytostatische und /
 oder immunsuppressive Eigenschaften besitzen, ferner als
 Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und
 Prophylaxe von Tumorerkrankungen sowie in der Transplantati-
 onsmedizin verwendet werden. Der Begriff Patient bezieht sich
 30 dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit
 können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin
 verwendet werden. Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen von
 Verbindungen gemäß den Ansprüchen können als Di- bis Oligome-
 re oder als deren Salze, Ester, Amide oder „Prodrugs“ vorlie-

An.146/Mar/Sieb

gen, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können dem Patienten 5 als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform (Aerosol) 10 verabreicht werden. Die intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intrathekale Gabe kann dabei kontinuierlich mittels einer Pumpe oder Dosiereinheit erfolgen. Dosierungsformen für die örtliche Administration der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen Salben, Puder, Zäpfchen, Sprays und 15 Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird dabei unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern, Verdünnungs- und Treibmitteln je nach Bedarf vermischt.

20

An.146/Mar/Sieb

[Beispiele]

Ausführungsbeispiel 1: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Thiophenol-Substrates sowie Zykлизierung

5 Das lineare Fengycin-Substrat wird zunächst nach Standardmethoden der Peptidfestphasensynthese hergestellt. Die Peptidsequenz lautet: Acetyl-Glu-D-Orn-Tyr-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-COOH. Im nächsten Schritt werden 0,05 mMol des Peptides mit 0,1 mMol DCC, 0,1 mMol HOBr und 0,5 mMol Thiophenol versetzt und in 2 ml THF gelöst. Das Gemisch röhrt für 30 min bei RT, und 0,05 mMol Kaliumkarbonat werden addiert. Das Gemisch röhrt für weitere 2,5 h bei RT, und darauf wird durch Filtration festes DCH abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Entschützung der Peptidseitenketten erfolgt für 3 h in 2 ml 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% Triisopropylsilan. Das Gemisch wird dann in 50 ml eiskalten Diethylether geschüttet und der entstehende Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt. Die Reinigung des Feststoffs erfolgt mittels präparativer HPLC mit einer C₁₈-

20 Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 7 µM, Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) mit einem Gradienten von 10% Acetonitril in Wasser/0,1% TFA auf 70% Acetonitril in Wasser/0,1% TFA in 40 min bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Retentionszeit des zyklierten Fengycins

25 (vgl. Fig. 1) beträgt 19 min. Die Ausbeute beträgt zwischen 70 und 80%.

Die Produkte werden mit LC-MS und MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Reinheit und Identität überprüft.

Ausführungsbeispiel 2: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates sowie Zykлизierung

Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates erfolgten analog zu Ausführungsbeispiel 1, wobei in Ausführungsbeispiel 2 0,05 mMol Benzylmercaptan an Stelle

An.146/Mar/Sieb

von 0,05 mMol Thiophenol eingesetzt werden. Die Ausbeute des zyklisierten Fengomycins beträgt etwa 70 %.

Ausführungsbeispiel 3: Herstellung und Reinigung weiterer
5 Fengycin-Substrate sowie Zyklisierung

Fengycin wird wie unter Ausführungsbeispiel 1 und 2 beschrieben mit weiteren erfindungsgemäßen Abgangsgruppen umgesetzt. Dabei handelt es sich um 2-Mercaptopyridin, p-Nitrothiophenol und Pentafluorthiophenol. Die Zyklisierung dieser Fengycin-Substrate ergibt deutlich höhere Anteile an nicht enzymatisch katalysiertem Zyklisierungsprodukt bzw. hydrolysiertem Produkt als im Falle der Verwendung von Thiophenol bzw. Benzylmercaptan.

15

An.146/Mar/Sieb

Tabelle 1.

Die linearen Peptide Fengycin, Surfactin, CDA und Syringomycin werden wie unter Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit Thiophenol umgesetzt und anschließend enzymatisch zyklisiert.

5 Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung der erhaltenen erfindungsgemäßen Substrate.

Verbindung	Spezies	Ionisationsmethode	Beobachtete Masse (berechnete Masse) (Da)
Fengycin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1361,40 (1361,60)
Surfactin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	965,40 (965,49)
CDA-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1519,30 (1519,5)
Syringomycin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1175,60 (1175,54)

[Abbildungslegenden]

Fig. 1: HPLC der Reaktion von Fengycin-Thiophenol mit der Fengycin-Peptidzyklase

5

HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

10 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

15 Fig. 2: HPLC der Reaktion von Surfactin-Thiophenol mit der Surfactin-Peptidzyklase

HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 20 1 zeigt die Kontrollreaktion ohne Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt, (Cy) nicht enzymatisch katalysierte Zyklisierung über eine Amino Seitengruppe in der Peptidsequenz an Position 3 (Dap).

Fig. 3: Fengycin-Peptidzyklase

5 µM der rekombinanten Fengycin-Peptidzyklase, die in vorhergehenden Untersuchungen keine Zyklisierungsaktivität mit konventionellen SNAC-Substraten zeigte, wird mit 100 µM Fengycin-Thiophenol für 10, 30, 40, 50, 60 min bei Raumtemperatur in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 in 50 µL Gesamtvolume inkubiert. Mit dieser Messung wird der lineare Bereich

An.146/Mar/Sieb

für weitere kinetische Studien ermittelt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 35 μ L TFA (4 % in Wasser) gestoppt und auf der analytischen HPLC mit einer C₁₈-Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3 μ m) mit dem folgenden Gradienten untersucht: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40 °C.

Kinetische Untersuchungen werden zu verschiedenen Zeitpunkten bei Substrat-Konzentrationen von 50 μ M bis 1000 μ M durchgeführt und die kinetischen Größen K_M und k_{cat} aus der Lineweaver-Burk-Auftragung entnommen. Für Fengycin-Thiophenol ergibt sich für die Zyklisierungsreaktion ein K_M von 461 μ M und ein k_{cat} von 0,33 min^{-1} .

15 Fig. 4: Surfactin-Peptidzyklase

Im Falle der Surfactin-Peptidzyklase existieren kinetische Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat. Im Falle von Surfactin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein K_M von 126 μ M und ein k_{cat} von 5,6 min^{-1} bestimmt, was einem k_{cat}/K_M Wert von 0,04 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ entspricht. Verglichen damit ist die kinetische Effizienz von Surfactin-SNAC, repräsentiert durch den k_{cat}/K_M Wert 0,0029 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, 14 mal niedriger als mit Surfactin-Thiophenol.

25 Fig. 5: CDA-Peptidzyklase

Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Zyklisierung von CDA-Thiophenol mit der „Calcium Dependent Antibiotic“ Peptidzyklase (CDA). Der K_M Wert für das Thiophenol-Substrat beträgt 10,7 μ M, und der k_{cat} Wert beläuft sich auf 0,21 min^{-1} . Die kinetische Effizienz des Thiophenol-Substrates mit einem k_{cat}/K_M Wert von 0,02 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ist zehnfach größer verglichen mit dem k_{cat}/K_M Wert von dem SNAC Substrat ($k_{cat}/K_M = 0,0021 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$).

An.146/Mar/Sieb

Fig. 6: Syringomycin-Peptidzyklase

Im Falle der Syringomycin-Peptidzyklase existieren keine kinetischen Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat, da dies in vorhergehenden Experimenten keine Aktivität zeigte. Im Falle 5 von Syringomycin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein K_m von 32,9 μM und ein k_{cat} von $0,805 \text{ min}^{-1}$ bestimmt, was einem k_{cat}/K_m Wert von $0,024 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ entspricht.

Fig. 7: HPLC der Reaktion von Surfactin-2-Thiophenol mit der 10 Surfactin-Peptidzyklase

HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 μm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 15 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

20

Fig. 8: HPLC der Reaktion von Surfactin-4-Methoxyphenylthiol mit der Surfactin-Peptidzyklase

25 HPLC-MS mit einer reversed phase C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 μm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym 30 (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

An.146/Mar/Sieb

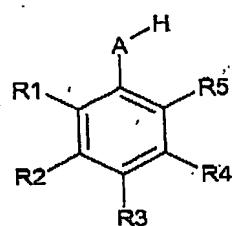
[Patentansprüche]

1. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem
 - eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt gebracht wird,
 - das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile Abgangsgruppe aktiviert ist,
 - der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucleophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Peptids abgespalten wird und
 - zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen gebildet werden,
15. dadurch gekennzeichnet, dass
 - die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des linearen Peptids chemisch verbunden ist und diesen aktiviert, ladungsstabilisiert ist und
 - die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgruppe der C-terminalen Carbonsäuregruppe des Peptids gebunden ist.
2. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den ladungsstabilisierten Abgangsgruppen um aromatische, heteroaromatische oder aliphatische Verbindungen handelt, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.
3. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Peptidzyklase um eine NRPS- oder PKS-Zyklase handelt, bevorzugt um eine gereinigte isolierte Thioesterase-Domäne.

An.146/Mar/Sieb

4. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das lineare Peptid in seinem Rückgrat proteinogene und / oder nicht proteinogene Aminosäuren enthält, wobei in das Rückgrat auch Reste eingebettet sein können, die sich nicht von Aminosäuren ableiten.

5. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine 10 Verbindung der Formel



(I)

handelt, wobei gilt:

A = O, S

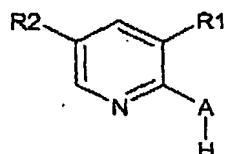
15 und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sein können:
 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

20 wobei
 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfache oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 25 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-

An.146/Mar/Sieb

cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

10 6. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(II)

15

handelt, wobei gilt:

A = O, S

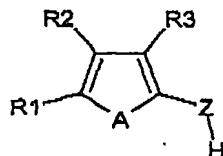
und wobei R1 und R2 unabhängig voneinander sein können:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,
wobei
25 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl; -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear
30 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für

An.146/Mar/Sieb

eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, 5 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt 10 sind.

7. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungestabilisierten Abgangsgruppe um eine 15 Verbindung der Formel



(III)

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

20 Z = O, S,

und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sein können:

-NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(-O)L, -C(-O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -

OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

25 Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

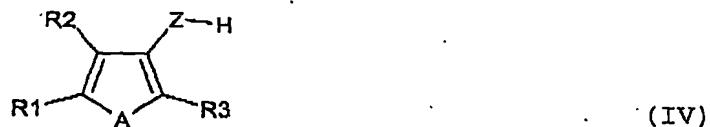
wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

30 für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl

An.146/Mar/Sieb

für eine einfache oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die hetero-
 5 cyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoff-
 atomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Hetero-
 atome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff,
 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aroma-
 tischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl
 10 für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis
 zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der
 Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt
 sind.
 15 8. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem
 der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es
 sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine
 Verbindung der Formel

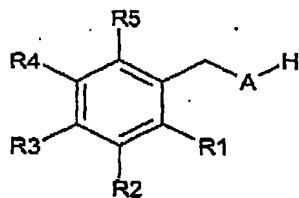


20 handelt, wobei gilt:
 A = O, S und
 Z = O, S,
 und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sein können:
 25 -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₂Cl, -SO₃H, -H, -NH₃⁺, -NL₃⁺, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O⁻, -NL₂, -NH₂, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO₂⁻, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,
 30 wobei

An.146/Mar/Sieb

1. = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

9. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es 20 sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(V)

handelt, wobei gilt:

25 A = O, S und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sein können:
 $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{H}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NL}_3^+$, $-\text{C}(=\text{O})\text{L}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{Het}$, $-\text{O}^-$, $-\text{NL}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OL}$, $-\text{OH}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{L}$, -

An.146/Mar/Sieb

OC(=O)L, -SL, -CO₂, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,
wobei

5 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear 10 oder verzweigt sein können, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, 15 Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt 20 sind.

10. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid, wobei die Substrate lineare Peptide sind, dadurch gekennzeichnet, dass nacheinander folgende Schritte ausgeführt werden:

25 - Versetzen der freien Peptidsäure mit einem den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenz, einem Kupplungsadditiv und einer ladungsstabilisierten Abgangsgruppe in einem Lösungsmittel
30 - Rühren bei Raumtemperatur;
- Zugabe einer Base und weiteres Rühren bei Raumtemperatur,
- Filtrieren,

An.146/Mar/Sieb

- Entfernen des Lösungsmittels,
- Entschützen des Peptids,
- Zugabe einer Peptid-Zyklase,
- Reinigung des erhaltenen zyklischen Peptids.

5 11. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Acylgruppe der C-terminalen Aminosäure des linearen Peptids an eine Abgangsgruppe nach einem der

10 Ansprüche 5 bis 9 gebunden ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgangsgruppe einen pK_A-Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 besitzt.

15 13. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivierungsreaganz für den freien C-Terminus oder eine Seitenketten-Carbonsäure der Peptidcarbonsäure DCC, DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl oder 3-Cl-1-Pyridiniumiodid verwendet wird.

20 14. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Kupplungsadditiv HOBt, HOAt oder HONB verwendet wird.

25 15. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen, bei denen bakterielle Infektionen auftreten.

An.146/Mar/Sieb

40/44

16. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der
Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Kits für die Her-
stellung zyklischer Peptide.

An.146/Mar/Sieb

[Zeichnungen]

Fig. 1:

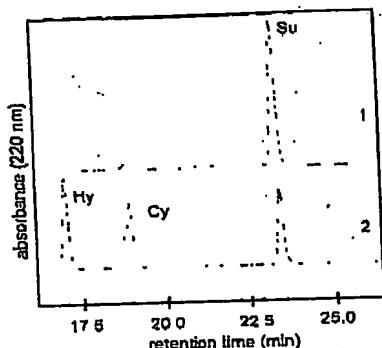


Fig. 2:

5

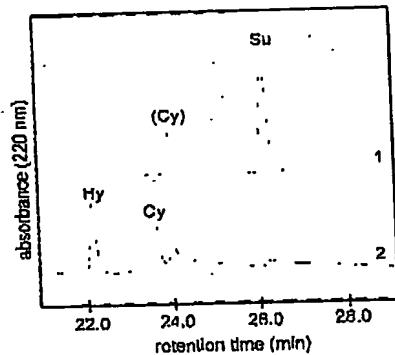
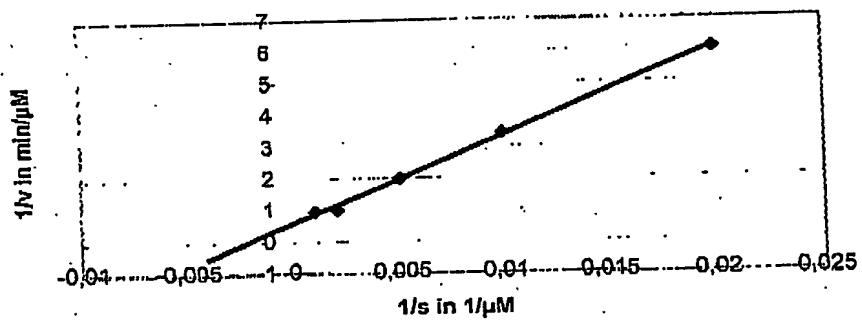


Fig. 3:

**Lineweaver-Burk Plot von Fengycin-Thiophenol
Zyklisierung**



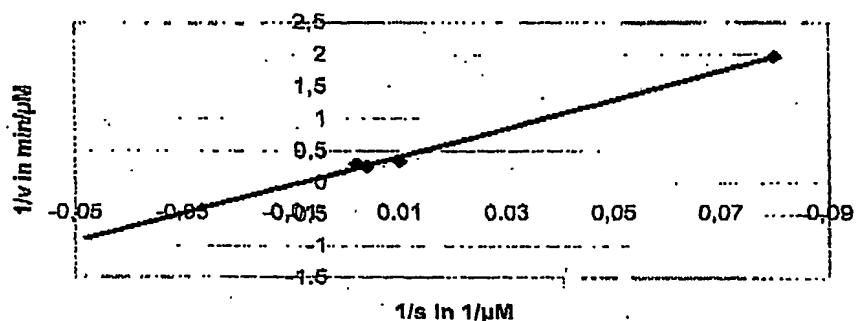
10

An. 146/Mar/Sieb

2/3, 44

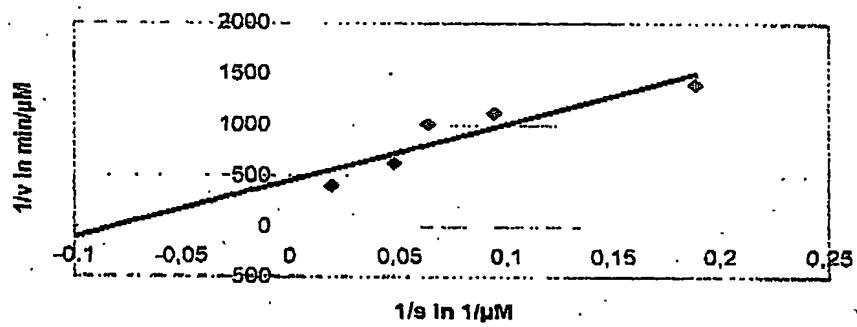
Fig. 4:

**Lineweaver-Burk Plot von Surfactin-Thiophenol
Zyklisierung**



5 Fig. 5:

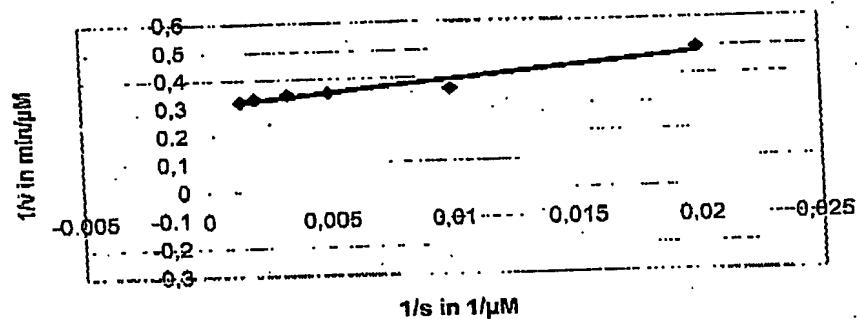
**Lineweaver-Burk Plot von CDA-Thiophenol
Zyklisierung**



An. 146/Mar/Sieb

Fig. 6:

**Lineweaver-Burk Plot von Syringomycin-Thiophenol
Zyklisierung**



5 Fig. 7:

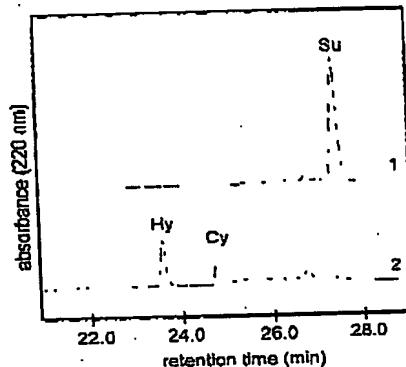
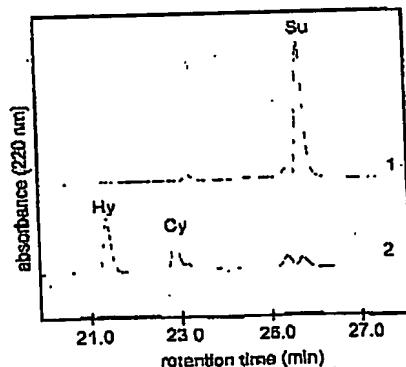


Fig. 8:



An. 146/Mar/Sieb

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.